

健脾益肺鼻炎方标准汤剂特征图谱的建立及4种指标成分的含量测定[△]

宛鑫^{1*},李得堂^{2#},张丽娟³,易美容²,祝赫²,何嘉仑²,陈洁²,唐洪梅²,丘振文²(1.广州中医药大学第一临床医学院,广州 510405;2.广州中医药大学第一附属医院药学部,广州 510405;3.广州中医药大学第一附属医院耳鼻喉科,广州 510405)

中图分类号 R917;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)16-1980-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.16.11



摘要 目的 建立健脾益肺鼻炎方标准汤剂的高效液相色谱(HPLC)特征图谱,筛选质量控制的指标成分并测定其含量。方法 采用HPLC法,结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》建立10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂的特征图谱,并进行相似度评价,确定共有特征峰;以特征图谱共有峰峰面积为变量,采用SPSS 26.0软件和SIMCA 14.1软件进行聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),筛选变量重要性投影(VIP)值大于1.5的差异性成分;采用同一HPLC法测定健脾益肺鼻炎方标准汤剂中升麻素和差异性成分的含量。结果 10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂共标定出24个共有特征峰,相似度均大于0.960,通过比对指出8个特征峰。CA和PCA结果显示,10批样品可聚为3类;OPLS-DA结果显示,VIP值大于1.5的成分共有3个,由大到小依次为升麻素苷(2号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(4号峰)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(6号峰)。升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和5-O-甲基维斯阿米醇苷4种成分的线性范围分别为0.010 7~0.213 0、0.007 8~0.156 0、0.008 0~0.160 0、0.009 8~0.195 0 μg ($r>0.999$);精密性、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD值均小于2%;平均加样回收率分别为105.98% (RSD=1.75%, $n=6$)、98.06% (RSD=3.87%, $n=6$)、96.38% (RSD=4.03%, $n=6$)、104.17% (RSD=1.27%, $n=6$)。10批样品中上述4种成分的含量分别为12.12~18.87、3.86~6.40、3.10~4.27、11.17~15.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 建立的HPLC特征图谱方法稳定可行,可用于健脾益肺鼻炎方标准汤剂的质量控制;升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和5-O-甲基维斯阿米醇苷可作为该标准汤剂质量控制的指标成分。

关键词 健脾益肺鼻炎方;标准汤剂;特征图谱;化学计量法

Establishment of characteristic chromatogram and content determination of 4 index components in Jianpi yifei biyan prescription standard decoction

WAN Xin¹, LI Detang², ZHANG Lijuan³, YI Meirong², ZHU He², HE Jialun², CHEN Jie², TANG Hongmei², QIU Zhenwen² (1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Dept. of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish HPLC characteristic chromatogram of Jianpi yifei biyan prescription standard decoction, to select the quality control index components and determine their contents. **METHODS** HPLC method combined with *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2004 edition) were used to establish the characteristic chromatogram of 10 batches of Jianpi yifei biyan prescription standard decoction; the similarity evaluation and common peaks identification were also carried out. Using common peak area of characteristic chromatogram as variables, SPSS 26.0 software and SIMCA 14.1 software were used to perform cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA); differential components with variable important in projection (VIP) value greater than 1.5 were screened; the contents of cimifugin and differential components were determined by the same method. **RESULTS** A total of 24 common characteristic peaks were identified, and the similarities of 10 batches of samples were higher than 0.960; eight characteristic peaks were identified by comparison with reference substance. CA and PCA results revealed that the samples were classified into 3 categories. OPLS-DA analysis

[△] 基金项目 广州市科技计划项目(No.202201020457);广东省基础与应用基础研究基金项目(No.2019A1515011745);广州中医药大学第一附属医院青年科研基金项目(No.2019QN22)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药新制剂开发与评价。E-mail:2456371968@qq.com

通信作者 副主任中药师,硕士生导师。研究方向:中药新制剂开发与评价。E-mail:lidetang2002@163.com

showed that 3 components with VIP value greater than 1.5, which were prim-*O*-glucosylcimifugin (peak 2), calycosin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (peak 4) and 5-*O*-methylvisammioside (peak 6) in descending order. The linear ranges of prim-*O*-glucosylcimifugin, calycosin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, cimifugin and 5-*O*-methylvisammioside were 0.010 7-0.213 0, 0.007 8-0.156 0, 0.008 0-0.160 0, 0.009 8-0.195 0 μg ($r > 0.999$), respectively. RSD values of precision, repeatability and stability tests (24 h) were all less than 2%. Average recoveries were 105.98% (RSD=1.75%, $n=6$), 98.06% (RSD=3.87%, $n=6$), 96.38% (RSD=4.03%, $n=6$) and 104.17% (RSD=1.27%, $n=6$). The contents of the above 4 components in 10 batches of samples were 12.12-18.87, 3.86-6.40, 3.10-4.27 and 11.17-15.79 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **CONCLUSIONS** The established HPLC characteristic chromatographic method is stable and feasible, it can be used for the quality control of Jianpi yifei biyan prescription standard decoction. Prim-*O*-glucosylcimifugin, calycosin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, cimifugin and 5-*O*-methylvisammioside can be used as the index components for quality control of the standard decoction.

KEYWORDS Jianpi yifei biyan prescription; standard decoction; characteristic chromatogram; stoichiometric analysis

中药复方制剂的开发大多源于长期临床实践中积累的验方和经典名方,具有较强的临床优势及中医特色,其开发过程也遵循“临床-实验-回归临床”的规律^[1-2]。健脾益肺鼻炎方为本课题组临床专家应用了10多年的临床验方,主要用于肺气虚寒型变应性鼻炎疾病的治疗。该方由黄芪、白术、防风、干姜、桂枝等8味中药组成,是在玉屏风散、桂枝汤、黄芪桂枝五物汤、辛夷散等经典名方基础上,经多年临床实践,不断加减化裁而成,具有健脾益肺、散寒通窍、益卫固表的功效。临床研究表明,健脾益肺鼻炎方治疗肺气虚寒型变应性鼻炎具有可靠的临床疗效,长期服用可显著改善患者流涕、鼻塞、鼻痒和打喷嚏等症状,减轻鼻部炎症反应,降低患者复发率^[3]。药理实验表明,方中君药黄芪的有效成分黄芪多糖可通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3、核转录因子 κB 和胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)等炎症因子的表达,显著改善卵清蛋白诱导的变应性鼻炎模型大鼠的黏膜炎症反应^[4-5]。为深入研究健脾益肺鼻炎方发挥疗效的物质基础,本研究以复方水煎液为模式标准,参照标准汤剂制备原则和《医疗机构中药煎药室管理规范》制备原则^[6],拟建立其标准汤剂的特征图谱,筛选影响其质量的主要指标成分,并对其进行含量测定,旨在为该方标准汤剂

的质量控制和进一步开发提供物质基准。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260型HPLC仪(美国Agilent公司)、MS-105DN型十万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、TG16-WS型台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)、KQ-400KDE型高功率数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

升麻素苷对照品(批号RFS-S00411804028)、升麻素对照品(批号S-007-180427)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号J-002-180731)、亥茅酚苷对照品(批号H-027-180426)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号M-020-190219)、毛蕊异黄酮对照品(批号M-021-180926)、芒柄花素对照品(批号C-018-181216)、木兰脂素对照品(批号RFS-M03111808031)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均大于97%;乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为蒸馏水。

黄芪、白术等8种中药饮片均购自广州中医药大学第一附属医院,由该院药学部李得堂副主任中药师鉴定均为真品。10批健脾益肺鼻炎方中8种中药饮片的来源信息见表1。

表1 10批健脾益肺鼻炎方中8种中药饮片来源信息

批次	黄芪		麸炒白术		防风		桂枝		干姜		桔梗		辛夷		白芷	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	甘肃	210601821	安徽	B4220230	陕西	200901	广东	201201	四川	210201	陕西	210501	河南	X4120113	四川	210301
S2	甘肃	H5120914, H5120813	安徽	200801	黑龙江	210201	广东	201201	四川	2012163	陕西	210120	河南	YBP010001	四川	2012075
S3	甘肃	H5121613	安徽	201287	内蒙古	F0469223	广西	210501	广西	210501	安徽	210201	河南	210501	安徽	201201
S4	甘肃	H5121613	安徽	201287	内蒙古	F0469223	广西	210501	四川	YPB1B0001	安徽	210201	河南	210501	安徽	201201
S5	甘肃	H5121613	安徽	2108005	内蒙古	F0469223	广西	210501	四川	YPB1B0001	安徽	210201	河南	210501	安徽	201201
S6	甘肃	H5121613	安徽	2108005	内蒙古	F0469223	广西	210501	四川	YPB1B0001	安徽	210201	河南	210501	安徽	201201
S7	甘肃	H5121613, 210602	安徽	2108005	内蒙古	F0469134	广西	210501	四川	YPB1B0001	安徽	210201	河南	X4121311	安徽	201201
S8	甘肃	210602	安徽	2108005	黑龙江	210601	广西	G2570212	广东	G5221312	安徽	J1421611	河南	X4121311	安徽	201201
S9	甘肃	210602, 210901	安徽	2108005	黑龙江	210601	广西	G2570212	广东	G5221312	安徽	J1421611	河南	X4121311	安徽	201201
S10	甘肃	200702	浙江	200801	黑龙江	200901	四川	200802	广西	201101	陕西	200403	河南	201001	四川	210301

2 方法与结果

2.1 HPLC 特征图谱的建立

2.1.1 标准汤剂的制备 取健脾益肺鼻炎方全方饮片(黄芪、麸炒白术、防风、桂枝、干姜、桔梗、辛夷、白芷各适量),以10倍量水(mL/g)浸泡30 min,先武火煮沸后文火煎煮60 min,滤过;药渣加入8倍量水(mL/g),先武火煮沸后文火煎煮40 min,过滤;合并2次滤液,小火浓缩至300 mL,即得标准汤剂,冷冻备用^[6]。

2.1.2 供试品溶液的制备 吸取“2.1.1”项下标准汤剂适量,以4 000 r/min离心20 min,精密量取上清液2 mL,加甲醇定容至10 mL,摇匀,以4 000 r/min离心10 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 取升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和木兰脂素对照品各适量,置于同一量瓶中,加甲醇溶解并定容至10 mL,制成上述各对照品质量浓度分别为21.3、15.6、16.0、19.5、20.3、15.5、13.9、17.0 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.4 色谱条件 色谱柱为YMC Hydrosphere C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);以乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min,15%A;10~28 min,15%A→23%A;28~36 min,23%A→31%A;36~41 min,31%A→32%A;41~46 min,32%A→40%A;46~52 min,40%A→47%A;52~62 min,47%A→60%A;62~70 min,60%A→75%A);流速为1 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为230 nm;进样量为10 μL。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),按“2.1.4”项下色谱条件连续进样6次,以6号峰为参照峰(该峰分离度较好),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对峰面积的RSD均小于4.00%(*n*=6),相对保留时间的RSD均小于1.00%(*n*=6),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,以6号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对峰面积的RSD均小于4.00%(*n*=6),相对保留时间的RSD均小于1.00%(*n*=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 取“2.1.1”项下标准汤剂(编号S1),按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,以6号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对峰面积的RSD均小于4.00%(*n*=6),相对保留时间的RSD均小于1.00%(*n*=6),表明方法重复性良好。

2.1.8 特征图谱的建立及共有峰的指认 分别精密吸取10批次健脾益肺鼻炎方标准汤剂,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定。

将所得的10批标准汤剂的HPLC色谱图以“AIA”格式文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》进行分析,以S7样品的HPLC色谱图为参照图谱(该批样品色谱峰分离度较好),6号峰为参照峰,采用中位数法生成10批样品的叠加特征图谱和对照特征图谱(R)。结果,10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂共标定出24个共有特征峰(图1)。经与“2.1.3”项下混合对照品的色谱图比对,共指认了8个特征峰,分别是升麻素苷(2号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(4号峰)、升麻素(5号峰)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(6号峰)、亥茅酚苷(12号峰)、毛蕊异黄酮(15号峰)、芒柄花素(19号峰)和木兰脂素(21号峰)。结果见图2。

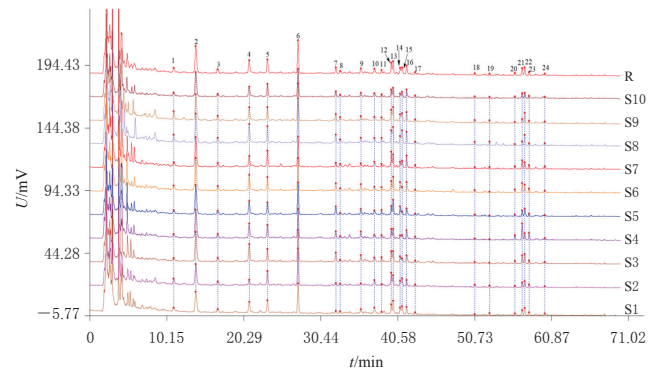
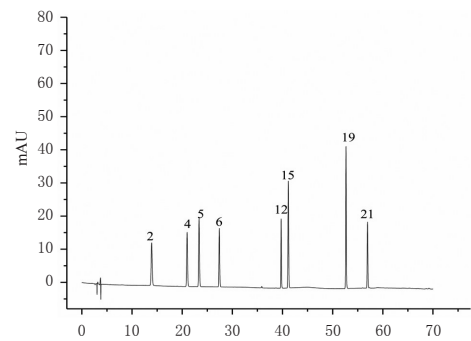
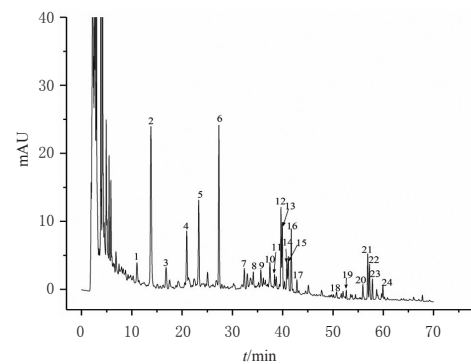


图1 10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂的HPLC叠加特征图谱与对照特征图谱(R)



A.混合对照品溶液



B.健脾益肺鼻炎方标准汤剂供试品溶液

2:升麻素苷;4:毛蕊异黄酮葡萄糖苷;5:升麻素;6:5-*O*-甲基维斯阿米醇苷;12:亥茅酚苷;15:毛蕊异黄酮;19:芒柄花素;21:木兰脂素

图2 混合对照品溶液和健脾益肺鼻炎方标准汤剂供试品溶液的HPLC图

2.1.9 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》对10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂进行相似度评价。结果显示,10批样品的相似度分别为0.993、0.968、0.991、0.981、0.994、0.995、0.991、0.989、0.993、0.997,相似度均大于0.960,表明10批次样品相似度较高,化学组分大致相同,质量相对稳定。

2.2 化学计量法分析

2.2.1 聚类分析 将10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂的24个共有特征峰峰面积量化处理,用SPSS 26.0软件分析,采用瓦尔德联接方法,数据以平方欧氏距离为测距,进行聚类分析(cluster analysis, CA)。结果见图3。结果显示,当平方欧氏距离为10时,10批样品聚为3类,S1、S2和S10聚为一类,S3~S7聚为一类,S8、S9聚为一类。

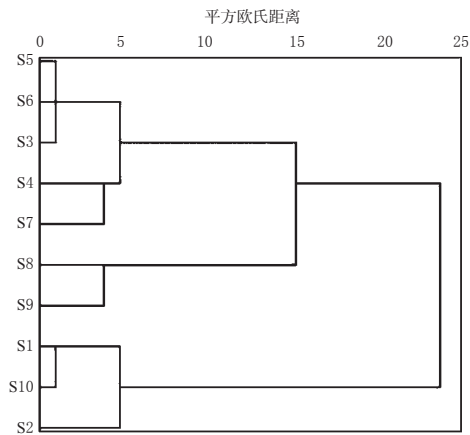


图3 10批样品CA树状图

2.2.2 主成分分析 以24个共有特征峰峰面积为初始数据,用SPSS 26.0进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。以特征值 >1 为提取标准,共确定出4个主成分,累计方差贡献率为87.509%,表明这4个主成分对健脾益肺鼻炎方标准汤剂质量评价具有良好的代表性。结果见表2(表中仅展示前4个主成分的相关数据)。以24个共有特征峰峰面积为变量,导入SIMCA 14.1软件进行PCA,结果见图4。结果显示,10批次样品可聚为3类,与CA结果一致。

表2 PCA的特征值和方差贡献率

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	8.457	35.238	35.238
2	6.500	27.083	62.320
3	4.548	18.951	81.271
4	1.497	6.238	87.509

2.2.3 正交偏最小二乘法-判别分析 采用SIMCA 14.1软件对10批健脾益肺鼻炎方标准汤剂的24个共有特征峰峰面积进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。结果显示,其模型解释率参数 R^2X 、 R^2Y 和预测能力参数 Q^2 分别为0.962、0.996、0.649,均大于0.5,说明该模型具

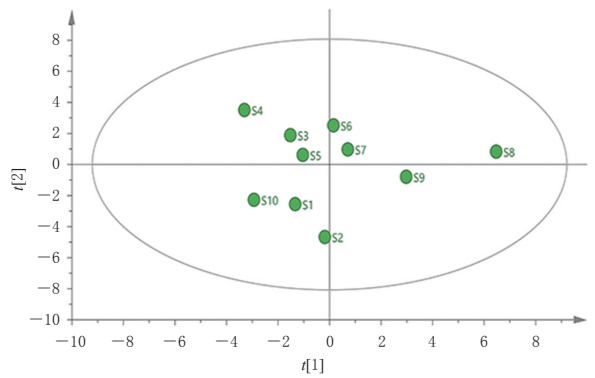


图4 10批样品的PCA图

有较好的拟合能力及预测能力^[7]。以变量重要性投影(variable important in projection, VIP)值 >1.5 作为筛选标准确定影响样品的差异变量(变量VIP值越高,对组间差异的影响越大),结果见图5。由图5可见,共有3个共有特征峰的VIP值 >1.5 ,依次为升麻素苷(2号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(4号峰)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(6号峰),表明这3个成分可能是影响健脾益肺鼻炎方标准汤剂质量差异的主要化学成分。

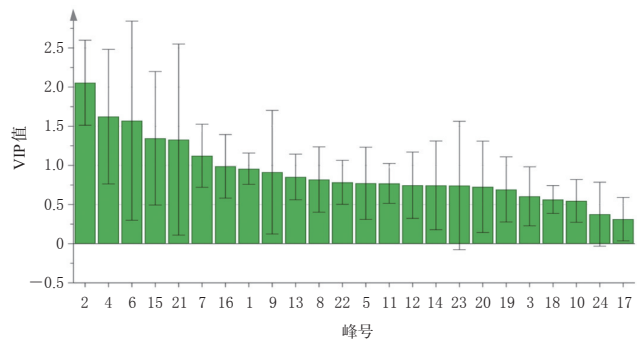


图5 24个共有特征峰OPLS-DA的VIP值图

2.3 含量测定

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液0.5、1、2、4、8、10 μL ,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分峰面积为纵坐标(Y)、进样量为横坐标(X)进行线性回归。结果,各成分在各自线性范围内线性关系良好,详见表3。

表3 各成分线性回归方程和线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围/ μg
升麻素苷	$Y=2.299.0X-4.602.7$	0.9998	0.0107~0.2130
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=3.262.4X-3.223.6$	0.9995	0.0078~0.1560
升麻素	$Y=3.952.2X-6.781.0$	0.9999	0.0080~0.1600
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y=2.469.8X-5.298.3$	0.9999	0.0098~0.1950

2.3.2 精密度的试验 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),按“2.1.4”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积RSD分别为0.17%、0.38%、0.36%、0.13% ($n=6$),表明仪器精密良好。

2.3.3 稳定性试验 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积的RSD分别为0.21%、1.34%、1.00%、0.18%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 精密量取“2.1.1”项下健脾益肺鼻炎方标准汤剂(编号S1),按“2.1.2”项下条件平行制备6份供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,采用外标法计算样品含量。结果显示,升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量的RSD分别为0.17%、0.38%、0.36%、0.13%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品各适量,分别加甲醇溶解并定容至10 mL,配制成质量浓度为163、107、103、120 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。精密量取健脾益肺鼻炎方标准汤剂(编号S5)1 mL,共6份,按质量比1:1精密加入各对照品溶液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,4种成分的平均加样回收率分别为105.98%、98.06%、96.38%、104.17%,RSD分别为1.75%、3.87%、4.03%、1.27%,表明方法准确度良好,结果见表4。

表4 4种成分加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/ %	平均加样回收率/ %	RSD/ %
升麻素苷	17.45	17.50	35.65	104.00	105.98	1.75
	17.45	17.50	36.03	106.17		
	17.45	17.50	36.06	106.34		
	17.45	17.50	35.58	103.60		
	17.45	17.50	36.28	107.60		
	17.45	17.50	36.38	108.17		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	4.75	4.80	9.26	93.96	98.06	3.87
	4.75	4.80	9.73	103.75		
	4.75	4.80	9.35	95.83		
	4.75	4.80	9.40	96.88		
	4.75	4.80	9.63	101.67		
	4.75	4.80	9.37	96.25		
升麻素	2.86	2.90	5.71	98.28	96.38	4.03
	2.86	2.90	5.49	90.69		
	2.86	2.90	5.55	92.76		
	2.86	2.90	5.66	96.55		
	2.86	2.90	5.75	99.66		
	2.86	2.90	5.77	100.34		
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	11.79	11.80	23.93	102.88	104.17	1.27
	11.79	11.80	24.10	104.32		
	11.79	11.80	24.06	103.98		
	11.79	11.80	23.96	103.14		
	11.79	11.80	24.07	104.07		
	11.79	11.80	24.37	106.61		

2.3.6 样品含量测定 精密量取10批次健脾益肺鼻炎方标准汤剂,按“2.1.2”项下方法制备10批供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。每个样品平行测定3次,取平均值。结果见表5。

表5 4种成分的含量测定结果($n=3, \mu\text{g/mL}$)

批号	升麻素苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	升麻素	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷
S1	12.12	3.86	3.81	11.19
S2	15.73	4.88	3.80	14.81
S3	18.24	6.40	3.54	11.17
S4	18.34	5.65	4.05	11.60
S5	16.64	4.48	3.10	11.43
S6	18.87	5.48	3.83	11.68
S7	15.69	3.99	3.92	11.76
S8	16.63	6.19	4.20	15.79
S9	15.49	4.63	3.82	13.47
S10	17.14	4.08	4.27	11.50

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本研究在建立特征图谱时,分别考察了Agilent ZORBAX Eclipses Plus C_{18} 、YMC Hydrosphere C_{18} 、Kromasil C_{18} 3种色谱柱,结果发现YMC Hydrosphere C_{18} 分离效果最好,出峰多且峰形较佳。又分别考察了甲醇-水、乙腈-水为流动相时的分离效果,结果发现,乙腈-水为流动相时色谱峰分离效果较优。为改善峰形及基线,分别考察了不同体积分数的磷酸溶液(0.02%、0.05%、0.1%),结果表明,0.05%磷酸溶液可较好地改善峰形和分离度,且色谱峰基线平稳。因此,选择乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相。又分别对不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)进行了考察,结果表明,在1.0 mL/min的流速下,色谱峰之间的分离度更优。本研究还考察了200~400 nm波长范围内的色谱峰效果,结果发现在230 nm下,各峰之间分离度较好,吸收峰多且基线平稳,故选择230 nm作为检测波长。

3.2 健脾益肺鼻炎方标准汤剂特征图谱的建立及定量指标的选择

中药复方标准汤剂为中医临床用药的主要形式,其作为一种标准物质和标准体系,可保障临床药效和质量的一致性^[8-9]。本研究收集了临床在用的10批处方饮片,以复方标准水煎液为模式标准,建立了化学特征图谱和对照标准色谱图,共确定了24个共有特征峰,相似度均大于0.960。通过与对照品比对,共指认出8个色谱峰。化学计量法CA、PCA和OPLS-DA评价结果显示,10批样品可分为3类,S1、S2和S10聚为一类,S3~S7聚为一类,S8、S9聚为一类;VIP值>1.5的色谱峰主要有3个,依次为升麻素苷(2号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(4号峰)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(6号峰),推测以上3个成分可能是影响样品质量差异的主要化学成分。

上述分析中,升麻素虽不是影响健脾益肺鼻炎方标准汤剂质量的重要差异成分,但多种研究表明,升麻素具有较强的抗炎作用^[10-11],可通过调节上皮细胞间的紧密连接,降低相关炎症因子 TSLP 和白介素 33 的表达,显著抑制异硫氰酸荧光素诱导的小鼠过敏性皮炎^[12]。因此,笔者建议可将升麻素也作为健脾益肺鼻炎方标准汤剂质量控制的指标成分,即将升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素 4 种成分共同作为 HPLC 的含量测定指标。含量测定结果显示,4 种成分的含量分别为 12.12~18.87、3.86~6.40、3.10~4.27、11.17~15.79 $\mu\text{g/mL}$,各批次成分含量测定具有一定的差异,可能与药材采收时间、采收地点、产地加工方式等多种因素有关,再次表明对该方标准汤剂建立全面规范的质量控制体系具有必要性。

综上所述,本研究建立的 HPLC 特征图谱方法稳定可行,可用于健脾益肺鼻炎方的质量控制;升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷可作为该方标准汤剂质量控制的指标成分。

参考文献

- [1] 成小兰,王倩,袁飞飞,等.以临床价值为导向的中药复方转化医学研究思路与方法[J].南京中医药大学学报,2021,37(5):648-653.
- [2] 平洋,李英鹏,吕邵娃,等.中药药剂复方药性传递理论的构建[J].中成药,2021,43(7):1823-1829.
- [3] 张丽娟,李得堂,庞志宇,等.玉屏风散加味方对肺气虚寒型变应性鼻炎患者的临床疗效及 IL-17A、TGF- β 1 表达的影响[J].云南中医学院学报,2018,41(4):41-46.
- [4] XU J T, ZHANG Q, LI Z X, et al. Astragalus polysaccharides attenuate ovalbumin-induced allergic rhinitis in rats

by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and NOD2-mediated NF- κ B activation[J]. J Med Food, 2021, 24(1):1-9.

- [5] 许江涛,张丽娟,霍宇航,等.黄芪多糖对肺气虚型变应性鼻炎大鼠 TSLP、OX40L mRNA 表达的影响[J].广州中医药大学学报,2020,37(9):1747-1752.
- [6] 陈士林,刘安,李琦,等.中药饮片标准汤剂研究策略[J].中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
- [7] 闫凯莉,尹程程,刘梦瑶,等.苓连润肺汤的 HPLC 指纹图谱建立、含量测定及多元统计分析[J].中国药房,2021,32(16):1956-1963.
- [8] 陈士林,刘昌孝,张铁军,等.基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议[J].中草药,2019,50(19):4519-4528.
- [9] 杨立伟,王海南,耿莲,等.基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(8):1-6.
- [10] LIU A M, ZHAO W, ZHANG B X, et al. Cimifugin ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting oxidative stress and inflammation via NF- κ B/MAPK pathway[J]. Biosci Rep, 2020, 40(6):BSR20200471.
- [11] YAN J J, YE F, JU Y, et al. Cimifugin relieves pruritus in psoriasis by inhibiting TRPV₄[J]. Cell Calcium, 2021, 97:102429.
- [12] WANG X Y, JIANG X Y, YU X, et al. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11):2926-2936.

(收稿日期:2022-02-24 修回日期:2022-06-27)

(编辑:曾海蓉)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅